

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. September 2005 (22.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/087944 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/04**,
1/68, 1/25

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002209

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. März 2005 (03.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 011 822.1 11. März 2004 (11.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **COGNIS DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG**
[DE/DE]; Rheinpromenade 1, 40789 Monheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KOPP-HOLTWIESCHE, Bettina** [DE/DE]; Tönisstrasse 29, 40599 Düsseldorf (DE). **WOLF, Elisabeth** [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 24, 40699 Erkrath (DE). **BREUER, Wolfgang** [DE/DE]; Clara-Schumannstrasse 13, 41352 Korschenbroich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindenerklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: QUALITY ENSUREMENT SYSTEM FOR DETECTING MICROORGANISMS

(54) Bezeichnung: QUALITÄTSSICHERUNGSSYSTEM ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a quality ensurement system for detecting reproducible microorganisms, comprising a) a system for enriching microorganisms in a sample in an over-night culture corresponding to 8-24 hours of cultivation in standard conditions according to international pharmaceutical statutes, food statutes and cosmetic laws or according to usual market indirect methods; b) a kit for detecting living, damaged or dead microorganisms in filterable and/or non-filterable samples or products, containing i) at least one reagent containing an inductor and a fluorescent reagent which leads to the formation of a specific enzyme in the case of living cells, released a fluorescent dye by means of reaction with a specific fluorescent dye reagent, said dye being detectable; ii) at least one nucleic acid probe for detecting microorganisms by in-situ hybridization, wherein the nucleic acid probe is bound to a fluorescent marker, wherein a detection limit < 10 CFU/g of is obtained for reproducible microorganisms. The invention also relates to the use of the inventive quality ensurement system and to a method for detecting living, damaged or dead microorganisms in filterable and/or non-filterable samples or products using the inventive quality ensurement system.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird ein Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend, a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Übernachtkultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen gemäss internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen oder gemäss marktüblicher Indirektmethoden b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten, enthaltend i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoffreagenz einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzt, der detek tierbar wird ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmarker gebunden ist bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g erreicht wird. Des weiteren wird die Verwendung des erfindungsgemässen Qualitätssicherungssystems und ein Verfahren zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten unter Anwendung des erfindungsgemässen Qualitätssicherungssystems vorgeschlagen.



WO 2005/087944 A1

Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von Mikroorganismen

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung befindet auf dem Gebiet des Nachweises von Mikroorganismen und der Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen.

Stand der Technik

Die Identifizierung von Mikroorganismen in Produkten konnte lange Zeit nur durch zeitaufwendige Kultivierung und einhergehender Amplifizierung erfolgen, wobei die geforderten Ergebnisse erst nach 1 bis 2 Wochen vorlagen. Die Kultivierung erfolgte beispielsweise für Bakterien, Pilze und einzellige Algen in den jeweils günstigsten Nährmedien.

Bei dieser Kontrolle wird überprüft, wie viele und welche Mikroorganismen pro Volumeneinheit im Endprodukt vorhanden sind. Hierbei sind vor allem die vermehrungsfähigen lebenden Mikroorganismen von Interesse, die eine unerwünschte Kontamination des Zwischen- oder Endproduktes hervorrufen können.

Eine klassische Methode ist beispielsweise die Membranfiltration, bei der die Proben kultiviert und filtriert werden und die Mikroorganismen auf der Membran verbleiben. Auf dieser Membran werden die Mikroorganismen vermehrt und identifiziert. Weitere Verfahren sind die Standprobe und teilweise auch die PCR (polymerase chain reaction). Da die PCR jedoch auch bei „nackter“ DNA positiv ausfällt, kommt es hier häufig zu falsch positiv Ergebnissen.

All diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass die Behandlung der Proben sehr aufwendig ist und erst frühestens nach mehreren Tagen bis Wochen das Ergebnis bekannt ist.

Weiterentwicklungen der bekannten Verfahren haben z.B. zu Methoden geführt, die es ermöglichen, in filtrierbaren Produkten wie Getränken über die sogenannten „Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT)“ lebende Zellen direkt zu identifizieren, indem Fluoreszenzfarbstoffe, welche an DNA binden und so die Synthese der RNA blockieren, in die Zellen gebracht werden und die Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Kroll, R.; Methods in Molecular Biology; 1995; 46; S 113-121). In der EP 386051 oder in DE 19841588 wird beispielsweise beschrieben, wie die DEFT-Methode durch Verwendung von Induktoren

zur Bildung bestimmter Enzyme in lebenden Mikroorganismen und anschließende Gabe eines Fluoreszenzreagenz, welches durch Reaktion mit dem gebildeten Enzym fluoresziert und dann detektiert werden kann, abgewandelt werden kann. Diese Methode wird jedoch nur für den Nachweis von coliformen Bakterien oder von Laktobazillen beschrieben. Des weiteren kann die DEFT-Methode in allen bekannten Abwandlungen nur für filtrierbare Produkte angewendet werden, was einen großen Nachteil darstellt. Bei dieser Methode ergibt sich zusätzlich das Problem der Nachweisgrenze. Es müssen mindestens zwischen 10 und 1000 Keime pro Fläche, die ausgezählt wird, vorhanden sein. Diese hohe Zahl an Mikroorganismen in einer Probe entspricht jedoch nicht den heutigen Hygieneanforderungen, so dass Systeme notwendig werden, die eine geringere Anzahl von Mikroorganismen in einer Probe schnell und ohne viel Aufwand detektierbar machen.

Für nichtfiltrierbare Produkte findet sich im Stand der Technik eine Methode, die durch *in-situ* Hybridisierung mit fluoreszierenden Nucleinsäuresonden zum Nachweis von spezifischen Mikroorganismen führt. Dieses als „FISH – Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung“ bezeichnete Verfahren dient zum Nachweis und zur Lokalisierung jeder Art von Nucleinsäuren in Zellen. Dabei wird mit Hilfe einer markierten RNA- oder DNA-Sonde eine molekulare Hybridisierung mit der in den Chromosomen befindlichen DNA/RNA durchgeführt. (FISH; Amann, R.L., W. Ludwig und K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbial. Rev. 59, S. 143–169; siehe auch DE 10160666). Die spezifische Hybridisierung der Sonde wird durch fluoreszenzmikroskopische Techniken nachgewiesen wie beispielsweise in DE 19936875 beschrieben.

Die FISH-Technik basiert auf der Tatsache, dass es in Bakterienzellen bestimmte Moleküle gibt, die aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion im Laufe der Evolution nur wenig mutiert wurden: Die 16S und die 23S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS). Beide sind Bestandteile der Ribosomen, den Orten der Proteinbiosynthese, und können aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Größe, und ihrer strukturellen und funktionellen Konstanz als spezifische Marker dienen. Die rRNA Datenbanken können dazu verwendet werden, art- und gattungsspezifische Gensonden zu konstruieren. Hierbei werden alle verfügbaren rRNA Sequenzen miteinander verglichen und für bestimmte Sequenzstellen Sonden entworfen, die spezifisch eine Bakterienart, -gattung oder -gruppe erfassen.

Bei der FISH -Technik werden diese Gensonden, die zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Gensonden sind in der Regel kleine, 16–20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und richten sich gegen eine Zielregion, welche typisch für eine Bakterienart oder eine Bakteriengruppe ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Gensonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so

bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Untersuchungen belegen jedoch, dass durch große Populationsschwankungen statistische Probleme bei der Probenahme bei diesen Methoden auftreten. Auch hier ergibt sich die Schwierigkeit der Nachweisgrenze, denn auch hier sind mindestens zwischen 10 und 1000 Keime pro Fläche, die ausgezählt wird, notwendig um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Diese hohe Zahl an Mikroorganismen in einer Probe entspricht nicht den heutigen Hygienestandards.

Obwohl laut internationalem Arzneimittelgesetzbuch (Ph. Eur.) eine Nachweisgrenze von < 100 CFU/g noch akzeptabel und hinreichend ist für den Vertrieb von Produkten, erwartet die Industrie und der Verbraucher heute eine weit geringere Nachweisgrenze bzw. sind die Hygieneanforderungen an Produkte heute so hoch, dass eine Nachweisgrenze < 10 CFU/g unausweichlich ist und eine Nachweisgrenze < 1 CFU/g angestrebt werden sollte.

Die Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von Mikroorganismen müssen immer sensitiver und bedienungsfreundlicher werden, um den Anforderungen an schnellen Nachweismethoden mit hoher Effizienz, niedrigen Nachweisgrenzen und geringem Aufwand für möglichst viele unterschiedliche Mikroorganismen gerecht zu werden. Dabei ist es oftmals ausreichend, wenn zunächst nur ein „Abwesenheitstest“ durchgeführt wird (Ja/Nein-Test) und getestet wird, ob überhaupt Mikroorganismen in der Probe enthalten sind, bevor diese taxonomisch bestimmt werden. Es ist zu zeitaufwendig und fordert zuviel Laborkapazität, wenn für die unterschiedlichsten Mikroorganismen viele Nachweismethoden angewendet werden müssen oder aus dem Angebot der unterschiedlichsten Methoden auf dem Markt die jeweils effektivste gewählt werden muss.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein System zur Verfügung zu stellen, mit dem sowohl filtrierbare als auch nicht filtrierbare Proben und Produkte untersucht werden und durch ein schnelles Verfahren der quantitative Nachweis verschiedenster Mikroorganismen sowohl lebend als auch tot möglich wird. Das System sollte es ermöglichen, Mikroorganismen mit einer Nachweisgrenze von < 10 CFU/g in der gewählten Probenmenge nachzuweisen. Das System sollte nicht nur speziell für einen Organismus anwendbar sein, sondern einen generellen Nachweis für Mikroorganismen in Proben und Produkten zur Verfügung stellen. Mit dem System sollte es auch möglich sein, den Hygienezustand von Produktionsanlagen zu überprüfen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend,

- 5 a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Übernachtkultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern (beispielsweise Ph.Eur.), Lebensmittelgesetzgebungen, Kosmetikverordnungen oder gemäß marktüblicher Indirektmethoden, wie beispielsweise eine Indirektmethode bei der das beim Wachstum der Mikroorganismen entstehende CO₂ bestimmt wird
- 10 b) ein Kit (aus dem englischen = Baukasten, Bausatz) zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten, enthaltend
- i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzreagenz einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzt, der detektierbar wird,
- 15 ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmarker gebunden ist,
- 20 bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g erreicht wird.

Bei den herkömmlichen Testmethoden werden in der Regel nur 0,1 g und max. 1 g der Probe entnommen und die Tests durchgeführt. Hier ergibt sich ein extremes statistisches Problem und idealerweise sollte ein möglichst großes Probenvolumen untersucht werden. Die herkömmlichen Testmethoden lassen jedoch nur eine Probenmenge in der genannten Größenordnung zu.

Die Kultivierung in „Übernachtkulturen“ entspricht zum einen den Standardmethoden, welche in dem internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen vorgeschrieben sind. Eine Übernachtkultur bedeutet dabei speziell, dass die Proben zwischen 8 und 24 Stunden, bevorzugt zwischen 10 und 20 Stunden und insbesondere zwischen 12 und 15 Stunden kultiviert werden. Die Standardbedingungen der Kultivierung sind dem Gesetzestext zu entnehmen. Geringfügige Abweichungen beispielsweise in den Konzentrationen der Nährmedienbestandteile, der Temperatur oder sonstiger Parameter der Standardmethoden für die Kultivierung sollen jedoch vom erfindungsgemäßen Qualitätssicherungssystem eingeschlossen sein. Ebenso sind eventuelle Änderungen im Gesetzestext für das erfindungsgemäße System anwendbar. Die Bedingungen müssen jedoch jeweils dokumentiert

werden damit eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen bestimmbar wird. So ist es von großer Bedeutung, welche Probenmenge eingesetzt wird.

Als alternative Standardmethode zu den Methoden aus dem internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen können erfindungsgemäß auch marktübliche Indirektmethoden zur Anreicherung verwendet werden. Eine beispielhafte Indirektmethode bestimmt das beim Wachstum der Mikroorganismen entstehende CO₂ durch Adsorption auf einer Membran und photometrischer Bestimmung in der Inkubationskammer. Diese Methode wird beispielsweise unter der Bezeichnung BacT/ALERT® von der Firma BioMérieux vermarktet.

Die Methode ist sehr sensitiv und zeigt eine potentielle Kontamination spätestens nach Übernachtskultur an, so dass das analytische Ergebnis spätestens nach 24 Stunden vorliegt.

Bei dieser Methode wird das zu untersuchende (ggf. verdünnte) Material steril in eine Nährmedienampulle eingesetzt. Die Ampulle wird in eine Probenzelle innerhalb einer beheizbaren Inkubations-Kammer eingesetzt.

Die Ampulle verfügt über eine gasdurchlässige Membran, die mit einer Nachweiskammer verbunden ist. In der Nachweis-Kammer befindet sich ein Indikator, der das beim Wachstum von Zellen entstehende CO₂ über die Membran adsorbiert und dessen Umschlag photometrisch in der Inkubationskammer gemessen wird.

Die so gewonnenen Messsignale werden auf elektronischem Weg für jede Probenzelle dokumentiert und in „Wachstumskurven“ (Zeit vs. CO₂ - Gehalt) umgesetzt.

Diese Methode wird heute bereits in der Medizin eingesetzt zur Sterilitätskontrolle von Blutbankproben, Blutkonserven, Knochen, Gewebestücken und anderen medizinisch relevanten Materialien.

Die Anwendung zur mikrobiologischen Qualitätssicherung von erfindungsgemäßen Proben wurde noch nicht beschrieben und erfindungsgemäß getestet.

Die Methode eignet sich für alle wassermischbaren und nicht wassermischbaren Flüssigkeiten sowie für Emulsionen, wachshaltige Perlglanze, Öle, Pasten und Feststoffe.

Eine definierte Menge – in der Regel 1 g – einer zu untersuchenden Probe wird unter sterilen Bedingungen in die Flüssigkeitskammer gegeben und zwischen 15° und 40°C, vorzugsweise bei 30°C, inkubiert. Sofern die Probe Keime enthält, werden sich diese unter CO₂ Entwicklung vermehren. Bei einem Befall von 1 – 100 Keimen pro ml ist die Gasbildung nach etwa 10 Generationszyklen und ca. ab 2 Stunden registrierbar. Im Positivfall kann sofort mittels der Reagenzien aus b i) oder b ii) und dem entsprechenden Verfahren das Material weiter analysiert werden

Sobald ein positiver Hinweis auf Kontamination vorliegt, kann der Typus der Kontamination verifiziert werden.

Erfindungsgemäß werden 1 bis 10 g, bevorzugt 5 g der zu untersuchenden Probe bzw. des zu
5 untersuchenden Produktes in 100 bis 1000 ml Standardlösung suspendiert und in der Über-
nachtkultur angereichert. Diese Behandlung ist oftmals notwendig, da die Proben teilweise
selbst hemmende Wirkung auf Mikroorganismen besitzen können. Um dennoch eine sehr
geringe Keimpopulation nachweisen zu können, die die gewünschte Qualität des Produktes
bei längerer Lagerung in Bezug auf Hygieneanforderungen zerstören könnte, bedarf es einer
10 Methode, die nach Verdünnung der Probe diese Keime noch nachweisen kann. Hierbei ergibt
sich jedoch das Problem der Nachweisgrenze, denn nach Verdünnung ist die Gesamtzahl der
Mikroorganismen für die sofortige Anwendung der Testmethoden DEFT oder FISH zu gering,
um eine Abwesenheitsprüfung durchführen zu können. Die erste Anforderung an das Quali-
tätssicherungssystem, eine Abwesenheitsprüfung für vermehrungsfähige Mikroorganismen
15 oder anders gesagt eine Ja/Nein-Bestimmung für vermehrungsfähige Mikroorganismen bereit-
zustellen, wird dadurch gegeben, dass durch die Übernachtkultur eine Nachweisgrenze von <
10 CFU/g erreicht wird. Insbesondere wird durch die angewendete Probenvorbereitung aus 5
bis 10 g Probe in 100 bis 1000 ml Standardlösung eine Nachweisgrenze von < 1 CFU/g er-
reicht, bzw. < 1 CFU/5g erreicht. Die von dem internationalen Arzneimittelgesetz geforderte
20 Mindestnachweisgrenze von < 100 CFU/g wird damit deutlich unterschritten. Damit kann der
heutige Hygienestandard, der für viele Produkte vom Verbraucher und von der Industrie ge-
fordert wird, eingehalten werden, weil ein Qualitätssicherungssystem entwickelt wurde, was
den schnellen Nachweis von geringsten Populationen vermehrungsfähiger Mikroorganismen
möglich macht.
25 Durch die Kombination von zwei Nachweismethoden in einem Kit wird es dem Anwender
möglich, direkt und parallel unterschiedliche Proben, Zwischenprodukte und Endprodukte zu
testen. So kann während eines Herstellungsprozesses in jeder Phase jedes Zwischenprodukt
unabhängig von der Konsistenz auf das Vorhandensein von Mikroorganismen untersucht wer-
den.
30 Der **Nachweis** von Mikroorganismen im Sinne der Erfindung bedeutet zum einen eine „Ja –
Nein“-Bestimmung zur Beantwortung der Frage, ob sich unerwünschte Mikroorganismen in
den zu untersuchenden Proben oder Produkten befinden und zum anderen anschließend je
nach untersuchter Probe oder Produkt die genaue Identifizierung des detektierten Mikroorga-
nismus. Welcher Nachweis erbracht wird, ist abhängig von der Konsistenz der Probe oder des
35 Produktes und damit von dem zu verwendenden Reagenz und der zu verwendenden Nuclein-
säuresonde.

Unter den Begriffen **Proben und Produkte** werden erfindungsgemäß sowohl Zwischenpro-
dukte als auch Endprodukte verstanden. Unter dem Begriff „Proben“ kann des weiteren auch

ein Anteil oder Teil eines Zwischenproduktes oder Endproduktes verstanden werden, beispielsweise der flüssige oder feste Anteil eines heterogenen Produktes oder Zwischenproduktes bevorzugt nach jeweils definierten Reaktionszeiten insbesondere zur Kontrolle eines gesamten Herstellungsprozesses. Erfindungsgemäß werden unter „Proben“ ebenfalls beispielsweise Rückstände von Reinigungsprozessen an Produktionsanlagen verstanden. Unter Endprodukte wird erfindungsgemäß sowohl das Endprodukt für den Verbraucher als auch das Rohprodukt verstanden, welches zum Verkauf steht und für die Herstellung von Endprodukten für den Verbraucher verwendet wird.

Proben können ebenfalls aus Industrieanlagen zur Effektivitätsprüfung nach einer Desinfektion stammen. Industrieanlagen werden regelmäßig mit Dampf oder mit chemischen Mitteln (Hypochlorite oder Wasserstoffperoxid) desinfiziert. Die Effektivitätsprüfung erfolgt – wenn überhaupt – bislang über klassische Verfahren. Oftmals werden allerdings Erfahrungswerte zur Wirksamkeit zugrunde gelegt, da die klassische Prüfung zu aufwendig ist. Mit dem erfindungsgemäßen System und Verfahren kann hier effektiv und schnell der Erfolg der Desinfektion geprüft werden.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „filtrierbare“ Probe oder Produkt, dass diese durch Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser durchgängig sind. Sie sollten also keine Öltröpfchen oder Feststoffpartikel oder ähnliches enthalten.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird aus dem erfindungsgemäßen Kit das Reagenz aus **b i)** für filtrierbare flüssige Proben und Produkte oder für filtrierbare flüssige Anteile der zu untersuchenden Proben und Produkte zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt. Indirekt können so auch tote Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Bei dieser Nachweismethode wird der Stoffwechselweg von der Induktion zur Bildung eines Enzyms durch die Aufnahme einer spezifischen Substanz untersucht. Die Induktion geschieht durch ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz, welches die Zellmembran passieren kann woraufhin intrazellulär die induzierten Enzyme die hochfluoreszierende Verbindung entstehen lassen. Zellen ohne intakter Zellmembran oder aktiven Stoffwechsel können das fluoreszierende Reaktionsprodukt nicht bilden und zeigen keine Fluoreszenz. Durch die Verwendung eines weiteren farbigen Reagenzes, welches sich in den toten Zellen anreichert da eine Reaktion durch das induzierte Enzym nicht stattfinden kann, ist eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich.

Erst wenn der Nachweis des Enzyms durch die Bildung des fluoreszierenden Reaktionsproduktes gelingt, ist sichergestellt, dass dieser Stoffwechselweg funktioniert und damit kann diesen Zellen ein funktionsfähiger Stoffwechsel und eine Vermehrungsfähigkeit zugeschrieben werden. Ein Ergebnis liegt bereits nach ca. einer Stunde vor. Zur Trennung der Zellen von den filtrierbaren Proben oder Produkten werden bevorzugt Membranfilter, insbesondere Poly-

carbonatfilter einer Porengröße von 0,2 bis 1,20 µm, bevorzugt 0,45 µm genutzt. Wenn es möglich ist, können die zu untersuchenden Proben und Produkte auch in geeigneter Weise verflüssigt werden. Zu dieser Probe wird ein Induktor des gesuchten Enzyms zugesetzt und anschließend ein Fluoreszenzreagenz, welches erst nach Reaktion mit dem gesuchten und induzierten Enzym seine Fluoreszenz entwickelt.

Zu diesen spezifischen Fluoreszenzreagenzien zählt beispielsweise Fluoresceindigalactosid zum Nachweis von Galactosidase welches durch Galactose als Induktor induziert wurde. Mit diesen Induktor und Fluoreszenzreagenz können Lactobazillen und coliforme Bakterien wie *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonaden* und weitere Prozesswasser-relevante Keime nachgewiesen werden.

Zu den **Fluoreszenzreagenzien** zählen erfindungsgemäß 4-Methylumbelliferon-Derivate, die speziell für bestimmte Enzyme derivatisiert werden. Beispielsweise findet 4-Methylumbelliferonheptanoat für den Nachweis von Lipase oder Esterase Anwendung. Für den Nachweis von Galactosidase kann auch 4-Methylumbelliferon-β-D-galactosid angewendet werden. Die Lösung wird dann durch die beschriebenen Mikrofilter filtriert und fluoreszensoptisch mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops untersucht.

In einer weiteren Anwendungsform werden die Indikatoren und Fluoreszenzreagenzien zu den Rückständen auf dem Filter gegeben.

In einer weiteren Ausführungsform wird aus dem Kit die **Nucleinsäuresonde aus b ii)** sowohl für filtrierbare flüssige Proben und Produkte als auch für nichtfiltrierbare Proben und Produkte als auch für Gemische aus filtrierbaren und nichtfiltrierbaren Proben und Produkten zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt.

Bei der Nucleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide, bevorzugt zwischen 12 und 500, bevorzugter zwischen 12 und 200, besonders bevorzugt zwischen 12 und 50 und zwischen 15 und 40, und am meisten bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide umfassen wird. Die Auswahl der Nucleinsäuresonden geschieht nach den Gesichtspunkten, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Durch diese Auswahl einer definierten Sequenz, kann dadurch eine Bakterienart, eine Bakteriengattung oder eine ganze Bakteriengruppe erfasst werden. Komplementarität sollte bei einer Sonde von 15 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere Fehlpaarungsstellen erlaubt.

Die Nucleinsäuresonden aus dem erfindungsgemäßen Kit sind in der Lage, durch unspezifische Nucleinsäuresonden unspezifisch Mikroorganismen nachzuweisen. Damit kann die oft

gestellte Frage geklärt werden, ob sich unerwünschte Mikroorganismen in Proben oder Produkten befinden, ohne den Mikroorganismus genau zu charakterisieren.

Die Hybridisierungsbedingungen und die Dauer der Hybridisierung werden je nach Produkt und zu untersuchender Probe in Abhängigkeit von der Nucleinsäuresonde angepasst.

5

Als detektierbare Marker für die Nucleinsäuresonden werden z. B. fluoreszierende Gruppen wie z. B. CY2 (erhältlich von Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), CY3 (ebenfalls erhältlich von Amersham Life Sciences), CY5 (ebenfalls zu beziehen von Amersham Life Sciences), FITC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), FLUOS (erhältlich von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), TRITC (erhältlich von Molecular Probes Inc. Eugene, USA), 6-FAM oder FLUOS-PRIME verwendet.

10

15

Das erfindungsgemäße Qualitätssicherungssystem kann zum Nachweis von gram pos. und/oder gram neg. Bakterien und/oder Hefen und/oder Schimmelpilzen und/oder Algen verwendet werden.

20

Zu den gram-pos. Bakterien zählen neben den umweltrelevanten auch medizinisch relevante Keime wie beispielsweise Staphylokokken, Streptokokken, Milzbrand-, Starrkrampf-, Milchsäure-, Diphtherie-, Schweinerotlauf- oder Heubakterien. Zu den gram-neg. Bakterien zählen ebenfalls neben den umweltrelevanten auch medizinisch relevante Keime wie Gonokokken, Meningokokken, Legionellen, Coli-, Typhus-, Rur- und Pestbakterien. Zu den umweltrelevanten und Mensch-assoziierten Keimen gehören unter anderem prozesswasserspezifische Keime wie Pseudomonaden, Burkholderien, Raoultellen, Klebsiellen, Corynebakterien und Bazillus-Arten.

25

In der mikrobiologischen Freigabe von Fertigprodukten kann durch das erfindungsgemäße Verfahren mit dem Reagenz aus b i) des Kits die Wiederfindungsrate von Mikroorganismen in gezielt angeimpften Produkten ermittelt werden. Neben Bakterien werden durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch Hefen und Schimmelpilze erfassbar. Als häufig angewendete Standardkeime zur gezielten Animpfung die zum Teil auch in den internationalen Pharmakopöen genannt sind, können eingesetzt und detektiert werden: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*.

30

35

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Qualitätssicherungssystems zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen. Die zu untersuchenden filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird aus Rohprodukten, Kosmetikprodukten, pharmazeutischen Zubereitungen, Nahrungsmitteln, Nah-

runrgsergänzungsmitteln, Textilhilfsmitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Farben und Lacke.

Unter **Rohprodukte** werden im Sinne der Erfindung Produkte verstanden, die zur Herstellung von Endprodukte für den Verbraucher verwendet werden. Hierbei kann es sich um Tenside, Ölkörper, Emulgatoren, Perlglanzwachse, Konsistenzgeber, Verdickungsmittel, Überfettungsmittel, Stabilisatoren, Polymere, Siliconverbindungen, Fette, Wachse, Lecithine, Phospholipide, UV-Lichtschutzfaktoren, Antioxidantien, Deodorantien, Antitranspirantien, Antischuppenmittel, Filmbildner, Quellmittel, Insektenrepellentien, Selbstbräuner, Tyrosinaseinhibitoren (Depigmentierungsmittel), Hydrotrope, Solubilisatoren, Konservierungsmittel, Parfümöle, nichtfiltrierbare O/W- und W/O-Emulsionen handeln. Prozesswasser ist ebenfalls als Rohstoff zu sehen.

Bei den **Kosmetikprodukten** kann es sich beispielsweise um Salben, Cremes, Lotionen, Shampoo, Conditioner, Duschgels, Badezusätze, dekorative Kosmetik wie Make up, Lidschatten, Lippenstift, Nagellack oder ähnliches handeln. Die **pharmazeutischen** Zubereitungen können in Form von Säften, Cremes, Salben, Lotionen, Suspensionen, Tinkturen, Tropfen oder ähnliches vorliegen.

Die **Nahrungsmittel** sind bevorzugt Milch oder Milchprodukte, Back- oder Fleischwaren, Getränke wie Mineralwasser, Bier, Limonade oder Fruchtsaft. Als **Nahrungsergänzungsmittel** werden bevorzugt Vitaminlösungen, ungesättigte Fettsäuren insbesondere konjugierte Linolsäuren, Konservierungsmittel oder Antioxidantien genannt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten bei dem das erfindungsgemäße Qualitätssicherungssystem angewendet wird, indem man die Proben

- a) zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden kultiviert unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen und
- b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten anwendet, indem man die angereicherte Probe
 - i) mit einem Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz inkubiert, welches in den Zellen die Bildung eines speziellen Enzyms induziert und dabei aus einem Fluoreszenzreagenz eine fluoreszierende Verbindung entstehen lässt, und/oder
 - ii) nach Fixieren der Bakterien diese mit einer Nucleinsäuresonde inkubiert, welche mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist um eine Hybridisierung herbeizuführen und

- c) die Fluoreszenz der Proben detektiert und mit der Anzahl der Zellen korreliert wobei die Anzahl der Zellen bestimmbar wird und beim Einsatz von b) i) zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden kann.

5

Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird unter "Fixieren" der Bakterien eine Behandlung verstanden, mit der die Bakterienhülle für Nukleinsäuresonden durchlässig gemacht wird. Zur Fixierung wird üblicherweise Ethanol verwendet. Es kann jedoch auch Methanol, Mischungen von Alkoholen, eine niederprozentige Paraformaldehydlösung oder eine verdünnte Formalde-

10

hydrlösung, enzymatische Behandlungen oder ähnliches verwendet werden. Für die "Hybridisierung" werden im Sinne der Erfindung die fixierten Bakterien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden inkubiert. Diese Nukleinsäuresonden, die aus einem Oligonukleotid und einem daran gebundenen Marker bestehen, können dann die Zellhülle penetrieren und sich an die der Nukleinsäuresonde entsprechenden Zielsequenz im Zellinneren binden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden können mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Verschiedene organische Lösungsmittel können hierbei in Konzentrationen von 0–80% eingesetzt werden. Durch das Einhalten von stringenten Hybridisierungsbedingungen wird gewährleistet, dass die Nukleinsäuresonde auch tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z. B. 0% Formamid in einem Hybridisierungspuffer wie er nachfolgend beschrieben ist. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20–80% Formamid im Hybridisierungspuffer.

15

20

Eine typische Hybridisierungslösung enthält 0%–80% Formamid, bevorzugt 20%–60% Formamid, besonders bevorzugt 35% Formamid. Sie hat außerdem eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l–1,5 mol/l, bevorzugt von 0,5 mol/l–1,0 mol/l, bevorzugter von 0,7 mol/l–0,9 mol/l, besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001%–0,2%, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005–0,05%, bevorzugter von 0,01–0,03%, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%. Zum Puffern der Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01–0,1 mol/l eingesetzt werden, bevorzugt von 0,01 bis 0,08 mol/l, in einem pH- Wert-Bereich von 6,0–9,0, bevorzugt 7,0 bis 8,0. Die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

30

35

Die Konzentration der Sonde kann je nach Markierung und Anzahl der zu erwartenden Zielstruktur stark schwanken. Um eine schnelle und effiziente Hybridisierung zu ermöglichen, sollte die Sondenmenge die Anzahl der Zielstrukturen um mehrere Größenordnungen über-

schreiten. Allerdings ist bei der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) darauf zu achten, dass eine zu hohe Menge an fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonde zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt. Die Menge an Sonde sollte deshalb in einem Bereich zwischen 0,5 ng/l und 500 ng/l, bevorzugt zwischen 1,0 ng/l und 100 ng/l und besonders bevorzugt bei 1, 0–50 ng/l liegen.

Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 1,5 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44°C und 48°C, besonders bevorzugt 46°C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergenzien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von den Nukleinsäuresonden, insbesondere deren Längen und dem Grad der Komplementarität zur Zielsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Nach erfolgter Hybridisierung werden die nicht hybridisierten und überschüssigen Nukleinsäuresondenmoleküle mittels einer herkömmlichen Waschlösung entfernt bzw. abgewaschen. Diese Waschlösung kann, falls gewünscht, 0,001–0,1% eines Detergens wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, sowie Tris- HCl in einer Konzentration von 0,001–0,1 mol/l, bevorzugt 0,01–0,05 mol/l, besonders bevorzugt 0,02 mol/l, enthalten. Weiter enthält die Waschlösung üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz von 0,003 mol/l bis 0,9 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,9 mol/l, beträgt. Des Weiteren kann die Waschlösung EDTA in einer Konzentration bis zu 0,01 mol/l enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 mol/l beträgt. Des weiteren werden zur Waschlösung noch Pufferlösungen eingesetzt, die den Hybridisierungspuffer in einer geringeren Salzkonzentration entsprechen.

Das "Abwaschen" der nicht gebundenen Nukleinsäuresondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 30°C bis 50°C, bevorzugt von 44°C bis 50°C und besonders bevorzugt bei 46°C für eine Dauer von 10–40 Minuten, vorzugsweise für 15 Minuten. Das Ergebnis bei Verwendung des erfindungsgemäßen Kits liegt nach 24 bis 48 Stunden vor. Die jeweiligen mit Fluoreszenzreagenz oder Fluoreszenzmarker behandelte Proben oder Produkte werden anschließend mit Hilfe eines Mikroskops, bevorzugt eines Epifluoreszenzmikroskops optisch detektiert.

Beispiele

Beispiel 1: Qualitätsanalyse von filtrierbaren Produkten mit der beschriebenen Verfahrens-kombination

Die Analysendauer liegt in der Regel bei 10 – 24 Stunden.

1. Probenvorbereitung

Alle Arbeiten haben unter sterilen / aseptischen Bedingungen zu erfolgen.

10 g einer zu untersuchenden Probe werden steril eingewogen und gemäß Ph.Eur. 2.6.12. bzw. 2.6.13 in 90 ml THLC1-Bouillon homogen vermischt. Die Lösung wird über einen 0,45 µl Membranfilter steril filtriert, das Filtrat wird verworfen. Der Filter wird mit 200 ml steriler Pufferlösung nachgespült. Auf dem Filter sind alle Keime, die ggf. in 10g Produkt enthalten sind, zurückgehalten.

15 Anschließend entnimmt man den Filter und überführt ihn komplett in ein steriles Gefäß mit 20 ml CASO-Bouillon (zur Bakterienanreicherung) oder Sabouraud Bouillon (zur Anreicherung von Hefen und Schimmelpilzen) (klassische Übernachtskultur) oder in eine BacT/ALERT® Flasche (Lym-Flasche mit 20 ml der jeweiligen Bouillon). Das BacT/ALERT® System eignet sich nicht für Proben, die bekanntermaßen zur autokatalytischen Freisetzung von CO₂ neigen, ohne daß mikrobielle Wechselwirkungen vorliegen. Bei den meisten kosmetischen und industriell genutzten Rohstoffen ist dies nicht der Fall.

Die so vorbereiteten Proben werden über Nacht bei 30 ± 5°C inkubiert. Bei Verdacht der Kontamination mit langsam wachsenden Organismen kann die in der Regel 8 stündige Voranreicherung auch bis zu 24 Stunden dauern.

2. Optische Prüfung der Anreicherungskultur bzw. Auswertung des Bact Alert Systems:

Sofern durch Mikroorganismen-Wachstum eine Trübung in der Anreicherungsbouillon erfolgt oder eine CO₂ Entwicklung im BacT/ALERT® -System zu messen ist, wird die Probe mit der FISH Technik weiter analysiert und eine Grobeinstufung in gram positive und gram negative Organismen vorgenommen, u.U. auch bis zur Keimspecies analysiert (vgl. Beispiel 2 : Nicht filtrierbare Produkte). Wenn keine Wachstum in der Anreicherung bzw. keine CO₂ Entwicklung im BacT/ALERT® -System zu beobachten ist, erfolgt eine Ergebnisverifizierung mittels DEFT Verfahren.

3. DEFT Prüfung auf Anwesenheit von Mikroorganismen

Aus der Anreicherungskultur werden 10 ml – dies entspricht einer Ausgangsproduktmenge von 5 g - mit einer sterilen Spritze entnommen und über einen 0,45 µm Polycarbonatfilter

filtriert. Der Polycarbonatfilter, auf dem die angereicherten Zellen liegen, wird auf ein den Fluoreszenzfarbstoff-haltigen DEFT-PAD gelegt und für 8 – 15 min bei 20- 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei geht der Farbstoff von dem PAD auf die Zellen über, während der Hintergrund des Polycarbonatfilters nicht angefärbt wird.

- 5 Nach der Inkubation wird der Filter vom Pad gelöst und auf einen Objektträger gelegt. Die Farbreaktion wird anschließend mit einer Fixierflüssigkeit gestoppt.
Das Präparat wird anschließend im Fluoreszenzmikroskop mit 100 facher Vergrößerung auf das Vorhandensein von angefärbten Zellen überprüft. Dabei wird der Filter komplett gescannt. Der Hintergrund des Filters muss dunkel sein. Die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen müssen eindeutige Ergebnisse liefern
- 10

4. Ergebnis:

- Werden rote Zellen detektiert, war das Präparat mit bereits abgestorbenen Zellen versetzt. In der Regel kommen solche Zellen aus der Umwelt und sind für die Qualität eines Präparates nicht relevant. Ausgenommen sind Produkte für die Parenteral-Anwendung. Hier sollte das Präparat weder rot noch grün fluoreszierende Zellkörper enthalten.
- 15

Werden grüne Zellen detektiert, handelt es sich um das Vorkommen von vermehrungsfähigen Zellen im Produkt. Das Produkt ist als mikrobiologisch kontaminiert einzustufen.

- Da bei dem Vorhandensein von grünen Zellen durch den vorgeschalteten Anreicherungsschritt eine Rückschlußfolgerung auf die Keimzahl im Ausgangsprodukt nicht erfolgen kann, ist das Verfahren als ja/nein bzw. nach Vorliegen entsprechender statistischer Daten als halbquantitativ einzustufen. Dies ist in der Regel für eine Qualitätsbewertung ausreichend, da das übergeordnete Ziel lautet „Nachweis der Abwesenheit von vermehrungsfähigen Keimen“.
- 20

25

3. Prüfung mittels Stammkeime im DEFT Verfahren

- Probevorbereitung analog Punkt 1 durchführen (Produktprobe Texapon NSO, IMQ 418935)
- Negativkontrollen des verwendeten Anreicherungs-Mediums mitführen
- 30 ➤ 1 Probenreihe für Nachweis der Stammkeime in Anwesenheit des Produktes einsetzen
- Zugabe von 0,2 ml Stammkeimlösung (Verdünnung entsprechend 10 – 100 KBE/10 ml) zu 20 ml Probelösung – Produkt bzw. Negativkontrolle und homogen vermischen
- 10 ml für klassische Keimzahlbestimmung mittels Filtration (HIPCO-Verfahren) und Bebrütung des Filters auf CASO-Medium für 3 – 5 Tage bei 30 – 35 °C
- 35 ➤ Restliche Menge für Anreicherung und DEFT 24 h einsetzen.
- Anreicherung und Bewertung des Tests analog Punkt 1 durchführen
- Keine Wachstumstrübung oder CO₂ Bildung – DEFT Prüfung

3.1 Ergebnisse – Nachweis von Stammkeime nach Anreicherung

Probenbezeichnung	Keimzahlbestimmung der eingesetzten Stammkeime im Filtrationsverfahren KBE/ pro Membranfilter bzw. pro 5 g angereichertes Produkt	Wachstum in Anreicherung und ggf. Ergebnis der DEFT-Prüfung nach Anreicherung KBE pro Membranfilter bzw. pro 5 g angereichertes Produkt
Produktprobe – angereichert	keine Zugabe	Anreicherung: keine Trübung DEFT: vereinzelt grünliche Kristalle, keine Mikroorganismenzellen
Negativkontrollprobe – Medium angereichert	keine Zugabe	Anreicherung: keine Trübung DEFT: vereinzelt grünliche Kristalle, keine Mikroorganismenzellen
Produktprobe+ E. coli Stammlösung	50	Anreicherung: starke Wachstums-trübung keine DEFT Prüfung möglich
Kontrollprobe + E. coli Stammlösung	51	Anreicherung: starke Wachstums-trübung keine DEFT Prüfung möglich
Produktprobe + Ps. aeruginosa Stammlösung	46	Anreicherung: keine Wachstums-trübung DEFT: > 1000 grüne Zellen
Kontrollprobe + Ps. aeruginosa Stammlösung	50	Anreicherung: starke Wachstums-trübung, keine Filtration und DEFT Prüfung möglich
Produktprobe + Candida albicans	21	Anreicherung: keine Wachstums-trübung DEFT: > 1000(grüne Zellen),
Kontrollprobe + Candida albicans	23	Anreicherung: keine Wachstums-trübung DEFT: > 1000(grüne Zellen),

5

Beispiel 2: Qualitätsanalyse von nicht-filtrierbaren Produkten mit der beschriebenen Verfahrenskombination

1. Probenvorbereitung

- 10 Alle Arbeiten haben unter sterilen / aseptischen Bedingungen zu erfolgen.
10 g einer zu untersuchenden Probe werden steril eingewogen und gemäß Ph.Eur. 2.6.12. bzw. 2.6.13 in 90 ml THLC1-Bouillon mit geeigneten Hilfsmitteln - vorzugsweise einem handelsüblichen Stomacher Gerät - homogen vermisch. Von dieser Suspension werden 10 ml entsprechend 1 g der zu untersuchenden Probe in 100 ml CASO bzw. Sabouraud-Bouillon
- 15 pipettiert.
Es ist auch möglich, 10 ml der Suspension in BacT/ALERT® Flaschen (Lym-Flasche mit 20 ml der jeweiligen Bouillon) zu überführen und in das BacT/ALERT® System einzusetzen, sofern die Probe nicht zur autokatalytischen Freisetzung von CO₂ neigt. .

Die Proben werden über Nacht, maximal bis 24 Stunden, bei 30 -35 °C inkubiert, um mikrobielles Wachstum zu ermöglichen.

2. Optische Prüfung der Anreicherungskultur bzw. Auswertung des BacT/ALERT® Systems:

Sofern die Anreicherung auf mikrobielle Kontamination hinweist (Bouillon-Trübung bzw. CO₂ Entwicklung im BacT/ALERT® -System), wird der qualitative FISH-Test durchgeführt und eine Unterscheidung zwischen gram-positiven und gram-negativen Zellen vorgenommen, was bereits einen ersten Hinweis auf die Kontaminationsquelle geben kann. Die weitere Differenzierung der Keimspecies erfolgt entweder mit Ausstrich auf Selektivmedien oder in PCR Verfahren.

3. Durchführung des FISH Tests zur Prüfung auf Anwesenheit von gram positiven und gram negativen Mikroorganismen (entsprechend Herstellerangaben)

15 Probenvorbereitung

- 100 µl der Probe in Eppendorfgefäß pipettieren
- 4 Tropfen Solution B 2 zutropfen und mit Probe mischen (= fixieren)
- Je 10 µl der fixierten Probe in die 5 Reaktionskammern (Feld 1, 2, 3 sowie die Positive- und Negativkontrollfelder) auf den Objektträger pipettieren
- Objektträger 30 – 60 min bei 35 – 37 °C inkubieren (trocknen)
- 24 µl Breakerlösung auf Reaktionsfeld 3 pipettieren und bei Raumtemperatur für 5 – 10 min inkubieren
- Je 1 Tropfen Breaker 4 auf Feld 3 und Breaker 2 auf Feld 2 tropfen und bei Raumtemperatur für 5 – 10 min inkubieren
- VIT Reaktor mit demin Wasser füllen und Objektträger waschen
- Objektträger 30 – 60 min bei 35 – 37 °C inkubieren (trocknen)
- Je 1 Tropfen Solution B2 zutropfen
- Objektträger 30 – 60 min bei 35 – 37 °C inkubieren

30 Kontakt mit Sonden

- Je 1 Tropfen „Positive Control“ auf Feld 1, 2 und 3 tropfen
- 1 Tropfen „Negative Control“ auf Negativ Kontrollfeld tropfen
- 1 Tropfen „Positive Control G“ auf Positiv Kontrollfeld tropfen
- Objektträger in VIT Reaktor schieben und 1,5 – 2 h min bei 44 - 46 °C inkubieren

Waschen

- Objektträger aus Reaktor entnehmen
- Reaktor mit warmen Waschpuffer füllen, Objektträger einschieben und für 15- 30 min bei 44 - 46 °C waschen
- Waschpuffer verwerfen
- Reaktor mit demineralisiertem. Wasser füllen und Objektträger nachwaschen
- Objektträger trocken bei 44 - 46 °C für 15 – 120 min

10 Mikroskopische Auswertung

- Reaktion stoppen mit Fixierflüssigkeit (Finisher)
- Deckglas auflegen und im Fluoreszenzlicht unter dem Mikroskop mit 100 facher Vergrößerung im SCAN Verfahren prüfen.
- Hintergrund muss dunkel sein, Positiv und Negativkontrollen müssen eindeutiges Ergebnis liefern, rot leuchtende Zellen werden als lebende Bakterien interpretiert

Ergebnis:

Feld 1 = Nachweis roten Zellen = gramnegative Mikroorganismen (z.B. Gattung Pseudomonaden, Enterobakterien)

20 Feld 2= Nachweis roten Zellen = grampositive Mikroorganismen (z.B. Gattung Lactobacillen, Bacillus, Listeria,)

Feld 3 = Nachweis roten Zellen = grampositive Mikroorganismen (z.B. Gattung Staphylococcus)

25 Bei Auftreten von Autofluoreszenzen in der Probe muss der Vorgang wiederholt werden und Positive Control D zugesetzt werden. Die Zellen sind dann grün gefärbt, jedoch ansonsten keine Veränderung der Aussagen

Angaben des Ergebnisses berechnet pro g Produkt und gemäß den produktspezifischen Grenzwerten.

30

4. Nachweis von Stammkeime mittels FISH Verfahren

- Probearbeitung analog Punkt 1 durchführen (Produktprobe Compound, IMQ 322015)
- 1 Probenreihe für Nachweis der Stammkeime in Anwesenheit des Produktes einsetzen - Zugabe von Stammkeimlösungen (Verdünnung der Keime entsprechend 10 – 100

KBE/1 g Produkt) zu 100 ml CASO-Bouillon – Produktprobe bzw. Negativkontrolle – und homogen vermischen

- Anreicherung und Bewertung des Tests analog Punkt 2 durchführen

5

Probenbezeichnung	Theoretische Keimzahl der eingesetzten Stammkeime (berechnet) KBE pro g Produkt	Ergebnis der FISH Prüfung nach Anreicherung KBE pro g angereichertes Produkt
Produktprobe – angereichert	keine Zugabe	Fish: Feld 1 bis 3 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Negativkontrollprobe – Medium angereichert	keine Zugabe	Fish: Feld 1 bis 3 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Produktprobe+ E. coli Stammlösung	78	Fish: Feld 1 – rote Zellen nachweisbar Feld 2 bis 3 keine Mikroorganismenzellen v
Kontrollprobe + E. coli Stammlösung	78	Fish: Feld 1 – rote Zellen nachweisbar Feld 2 bis 3 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Produktprobe + Ps. aeruginosa Stammlösung	32	Fish: Feld 1 – rote Zellen nachweisbar Feld 2 bis 3 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Kontrollprobe + Ps. aeruginosa Stammlösung	32	Fish: Feld 1 – rote Zellen nachweisbar Feld 2 bis 3 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Produktprobe + Staphylococcus aureus	98	Fish: Feld 3 – rote Zellen nachweisbar Feld 1 und 2 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar
Kontrollprobe +Staphylococcus aureus	98	Fish: Feld 3 – rote Zellen nachweisbar Feld 1 und 2 keine Mikroorganismenzellen nachweisbar

5. Bewertung

- 10 Da bei dem Vorhandensein von Zellen durch den vorgeschalteten Anreicherungsschritt eine Rückschlußfolgerung auf die Keimzahl im Ausgangsprodukt nicht erfolgen kann, ist das Verfahren als ja/ nein einzustufen. Dies ist in der Regel für eine Qualitätsbewertung ausreichend, da das übergeordnete Ziel lautet „Nachweis der Abwesenheit von vermehrungsfähigen Keimen“.

Patentansprüche

5 1) Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend,

a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Über-
nachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingun-
gen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern (beispielsweise Ph.Eur.), Le-
bensmittelgesetzgebungen, Kosmetikverordnungen oder gemäß anderer marktübli-
cher Indirektmethoden,

10 b) ein Kit (aus dem englischen = Baukasten, Bausatz) zum Nachweis lebender, geschä-
digter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Pro-
dukten, enthaltend

15 i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz
das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches
durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzreagenz einen Fluoreszenz-
farbstoff freisetzt, der detektierbar wird,

20 ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über
in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmar-
ker gebunden ist,

bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g
erreicht wird.

25 2) Qualitätssicherungssystem gemäß Anspruch 1, bei dem eine Nachweisgrenze für ver-
mehrungsfähige Mikroorganismen von < 1 CFU/g erreicht wird.

3) Kit gemäß Anspruch 1, wobei das Reagenz aus b i) für filtrierbare flüssige Proben und
Produkte oder für filtrierbare flüssige Anteile der zu untersuchenden Proben und Pro-
dukte zum Nachweis von lebenden und indirekt zum Nachweis von toten Mikroorga-
nismen eingesetzt werden kann.

30 4) Kit gemäß Anspruch 1, wobei die Nucleinsäuresonde aus b ii) sowohl für filtrierbare
flüssige Proben und Produkte als auch für nichtfiltrierbare Proben und Produkte als auch
für Gemische aus filtrierbaren und nichtfiltrierbaren Proben und Produkten zum Nach-
weis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt werden kann.

- 5) Qualitätssicherungssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zum Nachweis von gram pos. und /oder gram neg. Bakterien und/oder Hefen und/oder Schimmelpilzen und/oder Algen.
- 6) Verwendung von Qualitätssicherungssystemen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen, wobei eine Nachweisgrenze von < 10 CFU/g erreicht wird.
- 7) Verwendung von Qualitätssicherungssystemen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis von Mikroorganismen zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird aus Rohprodukten, Kosmetikprodukten, pharmazeutischen Zubereitungen, Nahrungsmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Getränken, Textilhilfsmitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Farben und Lacke.
- 8) Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten bei dem ein Qualitätssicherungssystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 angewendet wird, indem man die Proben
- a) zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden kultiviert unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen, Kosmetikverordnungen oder gemäß marktüblicher Indirektmethoden und
 - b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten anwendet, indem man die angereicherte Probe
 - i) mit einem Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz inkubiert, welches in den Zellen die Bildung eines speziellen Enzyms induziert und dabei aus einem Fluoreszenzreagenz eine fluoreszierende Verbindung entstehen lässt, und/oder
 - ii) nach Fixieren der Bakterien diese mit einer Nucleinsäuresonde inkubiert, welche mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist um eine Hybridisierung herbeizuführen und
 - c) die Fluoreszenz der Proben detektiert und mit der Anzahl der Zellen korreliert wobei die Anzahl der Zellen bestimmbar wird und beim Einsatz von b) i) zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden kann.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/25

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/68421 A (VERMICON AG; SNAIDR, JIRI) 16 November 2000 (2000-11-16) cited in the application the whole document	1,2,4-8
X	DE 198 41 588 A1 (NITZSCHE, FRANK; EGGERS, GUIDO) 23 March 2000 (2000-03-23) cited in the application the whole document	1-3,5-8
X	WO 89/04372 A (BERG, JAMES, D) 18 May 1989 (1989-05-18) cited in the application the whole document	1-3,5-8
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2005

Date of mailing of the international search report

23/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002209

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORENO Y ET AL: "Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization" RESEARCH IN MICROBIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 152, no. 6, July 2001 (2001-07), pages 577-582, XP002257723 ISSN: 0923-2508 the whole document	1,2,4-8
X	MORENO YOLANDA ET AL: "Specific detection of Arcobacter and Campylobacter strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 69, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 1181-1186, XP002327840 ISSN: 0099-2240 the whole document	1,2,4-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002209

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0068421	A	16-11-2000	DE 19936875 A1	16-11-2000
			AU 773559 B2	27-05-2004
			AU 4916300 A	21-11-2000
			CA 2369577 A1	16-11-2000
			WO 0068421 A2	16-11-2000
			EP 1177319 A2	06-02-2002
			JP 2002543800 T	24-12-2002
			US 2003032007 A1	13-02-2003
DE 19841588	A1	23-03-2000	AU 1149300 A	03-04-2000
			WO 0015832 A1	23-03-2000
			DE 19981818 D2	27-09-2001
			EP 1119638 A1	01-08-2001
WO 8904372	A	18-05-1989	AT 117378 T	15-02-1995
			AT 147790 T	15-02-1997
			AU 2602488 A	01-06-1989
			DE 3852825 D1	02-03-1995
			DE 3852825 T2	18-05-1995
			DE 3855762 D1	27-02-1997
			DE 3855762 T2	07-05-1997
			EP 0386051 A1	12-09-1990
			EP 0574977 A1	22-12-1993
			WO 8904372 A1	18-05-1989
			US 5518894 A	21-05-1996
			US 5292644 A	08-03-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002209

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/25

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/68421 A (VERMICON AG; SNAIDR, JIRI) 16. November 2000 (2000-11-16) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2,4-8
X	DE 198 41 588 A1 (NITZSCHE, FRANK; EGGERS, GUIDO) 23. März 2000 (2000-03-23) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-3,5-8
X	WO 89/04372 A (BERG, JAMES, D) 18. Mai 1989 (1989-05-18) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-3,5-8
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Mai 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MORENO Y ET AL: "Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization" RESEARCH IN MICROBIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 152, Nr. 6, Juli 2001 (2001-07), Seiten 577-582, XP002257723 ISSN: 0923-2508 das ganze Dokument	1,2,4-8
X	MORENO YOLANDA ET AL: "Specific detection of Arcobacter and Campylobacter strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 69, Nr. 2, Februar 2003 (2003-02), Seiten 1181-1186, XP002327840 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1,2,4-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002209

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0068421 A	16-11-2000	DE 19936875 A1	16-11-2000
		AU 773559 B2	27-05-2004
		AU 4916300 A	21-11-2000
		CA 2369577 A1	16-11-2000
		WO 0068421 A2	16-11-2000
		EP 1177319 A2	06-02-2002
		JP 2002543800 T	24-12-2002
		US 2003032007 A1	13-02-2003
DE 19841588 A1	23-03-2000	AU 1149300 A	03-04-2000
		WO 0015832 A1	23-03-2000
		DE 19981818 D2	27-09-2001
		EP 1119638 A1	01-08-2001
WO 8904372 A	18-05-1989	AT 117378 T	15-02-1995
		AT 147790 T	15-02-1997
		AU 2602488 A	01-06-1989
		DE 3852825 D1	02-03-1995
		DE 3852825 T2	18-05-1995
		DE 3855762 D1	27-02-1997
		DE 3855762 T2	07-05-1997
		EP 0386051 A1	12-09-1990
		EP 0574977 A1	22-12-1993
		WO 8904372 A1	18-05-1989
		US 5518894 A	21-05-1996
		US 5292644 A	08-03-1994